

F-element en la embriogénesis temprana y regeneración del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*

Laura Lebrón Mora^{1,2*}, Natalia Azpiazu Torres²

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. lauralebronmora@gmail.com ² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, 28049 Madrid, España

Resumen

La heterocromatina y la eucromatina son los dos tipos de organizaciones estructurales que puede adquirir la cromatina. Las regiones de heterocromatina presentan un alto nivel de empaquetamiento asociado al silenciamiento genético, al dificultar la entrada de la maquinaria de transcripción. En su mayoría están compuestas por secuencias satélite, retrovirus y transposones, con una baja densidad de genes, al contrario que las regiones de eucromatina, que presentan una conformación estructural más versátil asociada a la expresión genética. Ambas conformaciones están asociadas a marcas epigenéticas, por ejemplo, la marca de expresión H3K4me2 y la de silenciamiento H3K9me3 están asociadas a eucromatina y heterocromatina respectivamente. En los últimos años, los transposones han cobrado relevancia al descubrirse un mecanismo de silenciamiento a nivel transcripcional que conlleva la formación de heterocromatina. En este mecanismo, conocido como silenciamiento cotranscripcional, participan las proteínas PIWI de la familia Argonauta. Piwi, que pertenece al subgrupo de proteínas PIWI, resulta de vital importancia en la embriogénesis temprana, al formar parte de los productos maternos heredados por el embrión. Piwi, guiada por ARNpi, se une a los transposones que están siendo transcritos por la ARN polimerasa II e inicia el silenciamiento cotranscripcional, dando lugar a la formación de heterocromatina. En el presente estudio, analizamos la expresión de la familia de transposones F-element de *Drosophila melanogaster* durante la embriogénesis temprana y la regeneración del disco imaginal de ala y observamos que la sobreexpresión de F-element en la embriogénesis temprana altera la aparición de la marca de expresión génica H3K4me2 en el tiempo, así como, la morfología de las células polares y la división sincrónica de los núcleos. Además, se observó que F-element es expresado por las células que regeneran la región del ala 30h después de inducir la muerte de la región del ala.

Palabras clave: F-element; embriogénesis temprana; H3K4me2; regeneración; disco imaginal de ala.

Recibido: 23 de junio de 2021 A incluir en la edición del artículo

Copyright: © 2021 Laura Lebrón Mora et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** lauralebronmora@gmail.com



Introducción

El material genético del núcleo de las células eucariotas se organiza estructuralmente en fibras de cromatina, que, a su vez, se organizan en nucleosomas, pequeños complejos proteicos formados por las proteínas estructurales histonas [1]. Según el nivel de empaquetamiento de la cromatina, ésta se puede clasificar de manera amplia en eucromatina y heterocromatina [2]. Las regiones de eucromatina poseen una elevada densidad de genes y una conformación estructural más laxa y versátil [1-2]. Por el contrario, las regiones de heterocromatina tienen un alto nivel de empaquetamiento y están compuestas por secuencias ampliamente repetidas: secuencias satélite y elementos transponibles como retrovirus y transposones. [2].

La organización de la cromatina en eucromatina o heterocromatina depende de la presencia de marcas epigenéticas asociadas a la expresión o silenciamiento génico respectivamente [1]. Las modificaciones de histonas son las marcas epigenéticas más comunes y dependen de una amplia red de enzimas modificadoras de histonas [1]. Una modificación característica de eucromatina es la H3K4me2 [3], mientras que la H3K9me3 es la modificación más relevante de la heterocromatina [1].

Aunque cada vez es más el conocimiento acerca de la epigenética, es poco lo que se sabe acerca de las señales que inician la adquisición del patrón epigenético para la regulación genética y la organización de la cromatina. En los últimos años, los transposones han cobrado especial relevancia al descubrirse la existencia de un mecanismo de silenciamiento de transposones a nivel transcripcional que conlleva la formación de heterocromatina [1,3,5]. Este mecanismo, conocido como silenciamiento cotranscripcional, se basa en el sistema de regulación genética guiada por ARN pequeño [1,3,5].

En la regulación genética mediada por ARNs pequeños, adquieren gran importancia las proteínas Argonauta [5], una familia de proteínas altamente conservadas en todas las especies que poseen este sistema de regulación genética [5-6]. A través de los dominios PAZ y PIWI, son capaces de unir con una alta especificidad [6], una variedad de ARN pequeños: microARN (miARN), ARN pequeño de interferencia

(ARNsi) y ARN que interactúa con PIWI (ARNpi) [5]. Estos ARN pequeños, guían a las proteínas Argonauta hacia secuencias de ARN complementarias, para inducir su silenciamiento gracias a su capacidad de cortar ARN (actividad Slicer en inglés) [1,3,6]. De forma general, las proteínas Argonauta se clasifican en dos subgrupos: AGO y PIWI [5]. *Drosophila* posee cinco proteínas Argonauta: Piwi, Aub y Ago-3, que se clasifican como proteínas PIWI; y Ago-1 y Ago-2, que se clasifican como proteínas AGO. [1,5-6]. Piwi destaca al ser la responsable del silenciamiento cotranscripcional de transposones en el núcleo durante la embriogénesis temprana [5].

Cuando múltiples copias de un transposón están siendo transcritas por la ARN polimerasa II en el embrión, Piwi es guiada por ARNpi hacia el nuevo transcrito, iniciando el silenciamiento cotranscripcional a través de la vía ARNpi [3,5-7]. Estudios acerca del silenciamiento y la regulación de elementos transponibles como el retrotransposón *gypsy* permitieron relacionar el silenciamiento cotranscripcional con la formación de heterocromatina [6]. La relación entre ambos sucesos reside en Panoramix, una enzima que interacciona con Piwi y que recluta, a su vez, a las enzimas Lsd1 y SetDB1, cuya función es desmetilar la H3K4me2 y tri-metilar la H3K9 (H3K9me3), respectivamente [3]. La marca H3K9me3 permite el reclutamiento de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) y otros factores necesarios para modificar la conformación de la cromatina a un estado de empaquetamiento mayor [1].

Los transposones se dividen en LTR o no-LTR, dependiendo de si poseen repeticiones terminales largas (LTR) en sus extremos [8,9]. Los elementos nucleares largos intercalados (LINEs) son un tipo de retrotransposones no-LTR, capaces de retrotranscribir su ARNm con proteínas codificadas por ellos mismos [9]. *Drosophila* posee ocho familias de LINEs entre las que se encuentra F-element [8], compuesta por repeticiones de entre 60-80 miembros [9] en regiones de heterocromatina [10]. F-element posee dos promotores que dan lugar a transcritos sentido y antisentido complementarios [11], cuya transcripción aumenta la formación de ARNdc y el inicio del silenciamiento cotranscripcional.

En 1996, Kerber et al. demostraron que F-element se expresa en la línea germinal y durante la embriogénesis temprana en *Drosophila* [8]. El desarrollo embrionario en *Drosophila* parte de un único núcleo en el centro del huevo, donde tienen lugar ocho divisiones nucleares sincrónicas [12]. En el ciclo 9, los núcleos migran a la periferia, donde se dividen sincrónicamente cuatro veces más para formar el blastodermo sincitial (ciclo 10) en menos de 1h y media [12]. En el ciclo 10, las células germinales, o células polares, se separan de las células del blastodermo en el extremo posterior del embrión [13]. En el ciclo 14, comienzan a celularizar los núcleos del blastodermo, que hasta ahora compartían un citoplasma común, y dejan de dividirse sincrónicamente para diferenciarse en distintos tipos celulares [12]. En torno a los ciclos 8/9, tiene lugar la transición materno-cigótica, en la que los productos maternos se van degradando y el genoma cigótico se activa [14]. Piwi, asociada a ARNpi, forma parte de los productos maternos heredados. Hasta el ciclo 10 se localiza en el citoplasma y a partir del ciclo 11, pasa a localizarse en los núcleos para iniciar el silenciamiento cotranscripcional de transposones [15-16]. Con la activación del genoma cigótico, comienzan a aparecer nuevas marcas epigenéticas en los núcleos del embrión. En el ciclo 12, la marca de activación génica H3K4me2 se establece de manera uniforme y en el ciclo 14, aparece la marca de heterocromatina H3K9me3 [13].

Drosophila siempre ha sido considerado un modelo animal excelente en biología del desarrollo, al facilitar el estudio de procesos como la embriogénesis o la regeneración [17]. En el estudio de la regeneración, resultan determinantes los discos imaginales, que son los precursores de las estructuras que conforman la mosca adulta [17]. Tanto el disco de ala como el de ojo, poseen capacidad regenerativa durante el estadio larvario. En el disco imaginal de ala, se ha demostrado que, tras inducir daño en la región del primordio de ala, las células vecinas de la región bisagra, son capaces de desdiferenciarse y especificarse hacia un fenotipo celular diferente para regenerar el tejido dañado [17].

Objetivos

En este estudio queremos analizar la distribución y función de F-element durante la embriogénesis temprana y ver si existe una relación con el proceso de diferenciación por el que pasan las células durante la regeneración del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.

Materiales y métodos

Cepas de *Drosophila* utilizadas

Los stocks de *Drosophila* utilizados en este estudio han sido: nos-Gal4, nub-Gal4;;tub-Gal80, UAS-Rpr, UAS-F-element, yw.

Fijación larvas

Las larvas son diseccionadas en PBS y fijadas a temperatura ambiente en paraformaldehído 4% 20 minutos (min), y en paraformaldehído 4%, Tritón 0.1% y DOC 0.1% otros 20min.

Fijación embriones

Los embriones son decorionados en lejía durante 2min y fijados en 8mL Heptano, 2.8mL PBS y 600μL formaldehído 37% durante 20min en rotación. A continuación, se retira el formaldehído, se añade metanol y se agita durante 1min. Una vez los embriones se depositan en el fondo de la solución, se retira el heptano y los embriones se traspasan a un tubo eppendorf. Por último, se realizan los siguientes lavados para rehidratar los embriones: 3x metanol, 1x metanol-PBT 1:1 y 2x PBT. Una segunda fijación de 15min en formaldehído 4% a es necesaria en aquellos embriones en los que se vayan a realizar hibridaciones *in situ*.

Hibridación in situ con sonda F-element

Tras fijar los embriones y larvas diseccionadas (ver métodos), se realizan una serie de lavados: 4x PBT y 1x PBT-solución de hibridación 1:1. A continuación, se realiza una primera incubación en solución de hibridación de 30min a 55°C seguida de una segunda incubación con la sonda de F-element diluida en solución de hibridación 1:50 durante toda la noche a 55°C. La sonda fue previamente incubada 10min a 80°C. Tras retirar la sonda, se realizan lavados de 15min: 2x sol. de hibridación a 55°C, 1x solución de hibridación-PBT 1:1 a 55°C y 2x PBT a temperatura ambiente. Posteriormente se llevan a cabo las siguientes incubaciones α -digoxigenina (hecho en oveja) 1:200 1 hora (h), α -oveja biotinilado 1:200 1 hora (h), Streptavidina (Elite ABC kit de VECTASTAIN®) 1:100 30min, TSA Fluorescein System kit (NEL701A001KT) 1:50 15min. Para marcar los núcleos, se incuban 5min con TO-PRO3 (ThermoFisher) 1:1000. Después de cada incubación se realizan tres lavados de 10min con PBT. El montaje final se realiza en el medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD (Invitrogen).

Tinción inmunohistoquímica de embriones

Tras fijar los embriones, incubar 10min en solución de bloqueo (BSA 10%). A continuación, incubar con los Ac 1rios (1:500) o durante toda la noche a 4°C; y posteriormente, incubar con los Ac 2rios fluorescentes (ThermoFisher) 1:200 1h en oscuridad a temperatura ambiente. Para marcar los núcleos, incubar 5min con TO-PRO3 (ThermoFisher) 1:1000. Tras cada incubación se realizan tres lavados de 15min con PBT. Los Ac 1rios utilizados fueron: α -H3K9me3 de conejo (Active Motif, 61379), α -H4K12ac de ratón (Active Motif, 39165), α -H3K4me2 de conejo (Active Motif, 39913) y α -HP1a de ratón (DSHB, C1A9).

Microscopio confocal

Todas las fotografías de las tinciones inmunohistoquímicas e hibridaciones *in situ* de larvas y embriones han sido tomadas con un microscopio confocal Leica (Solms, Germany) DB5500 B.

Inducción de muerte en disco imaginal de ala. Sistema GAL4/GAL80xUASRpr

Larvas con genotipo nub-Gal4/tub-Gal80^{ts}xUAS-Rpr se mantienen a 17°C hasta que alcanzan el estadio de larva 3, momento en el que pasan a mantenerse a 29°C durante 24h para permitir la expresión del transgén *Rpr*. Transcurridas 24h se vuelven a mantener a 17°C durante 0h, 24h y 30h. Finalmente, las larvas son diseccionadas y fijadas (ver métodos) para realizar hibridaciones *in situ* con la sonda de F-element.

Inducción de muerte en disco imaginal de ala. Rayos X

Embriones wt y con genotipo nubGAL4/UAS-F-element se mantienen tres días a 25°C. Entonces, son sometidas a una única dosis de radiación de 3000R (6min 12 segundos) con la máquina de rayos X Phillips MG102 y se vuelven a mantener a 25°C. A las 24 y 48h parte de las larvas en estadio 3 son diseccionadas y fijadas (ver métodos) para hibridación *in situ* con la sonda F-element. El resto continúan su desarrollo hasta la etapa adulta para evaluar estadísticamente el nivel de recuperación del ala. Las fotografías de las alas han sido tomadas con una lupa Leica MZ12 conectada a una cámara Leica DFC490.

Análisis expresión F-element en embriones por RT-qPCR

La expresión relativa del transposón F-element con respecto al gen *Rpl32* se analiza mediante RT-qPCR en embriones wt y nos-Gal4/UAS-F-element agrupados por tiempos de desarrollo: 0-2h, 2-4h y 4-6h. El ARN total de los embriones se extrae siguiendo el protocolo del kit “NZY Total RNA isolation” (nzytech) y a continuación, se retrosintetiza el ADNc siguiendo el protocolo del kit “NZY First-Strand cDNA Synthesis” (nzytech). Las reacciones se hacen por duplicado con el NZY qPCR Green Master Mix (nzytech) y se analizan en un aparato LightCycler II (1.5) (Roche) bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización 95°C, amplificación 60°C (30 ciclos), elongación final 72°C (7min). Los niveles de expresión relativa de F-element se calcularon mediante el método del Ct comparativo (2- $\Delta\Delta$ Ct) con Microsoft™ Excel 2016, empleando como control interno al gen *Rpl32*, que codifica para la proteína ribosomal L32 60S. Los resultados obtenidos se muestran como media \pm desviación estándar en gráficos agrupados creados con el software Prism9 (GraphPad).

Rpl32 primer forward 5'- AGC ATA CAG GCC CAA GAT CG - 3'

Rpl32 primer reverse 5'- TGT TGT CGA TAC CCT TGG GC - 3'

F-element primer forward 5'- AGA TCC GGC AGA CAT TCA G - 3'

F-element primer reverse 5'- ACT TGA CAG GCC CAA CCC C - 3'

Extracción de histonas

Disgregar los embriones en buffer de lisis hipotónico (10mM TRIS pH 8, 1mM KCl, 1mM DTT, 1.5mM MgCl₂, 1 comprimido del cocktail de inhibidor de proteasas (Roche cOmplete™, 04693124001)) e incubar 2h en rotación a 4°C. Recuperar los núcleos por centrifugación a 10.000g 10min.

Tras descartar el sobrenadante, resuspender los núcleos en 400μL de HCl 0.2N e incubar en rotación 30min. Para eliminar los desechos nucleares centrifugar a 16.000g 10min y transferir el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Las histonas se precipitan con TCA según el siguiente protocolo: añadir 132μL de TCA gota a gota, mezclar por inversión e incubar 30min en hielo. Centrifugar a 16.000g 10min y desechar el sobrenadante. Realizar dos lavados con acetona sin disgregar el pellet y centrifugar a 16.000g 5min. Dejar secar el pellet 20min a temperatura ambiente y resuspender en 100μL de agua destilada.

Western Blot

Para la electroforesis de las histonas se utiliza un gel SDS-PAGE al 12% precedido por un gel apilador del 5%. 10μL, 15μL y 20μL de histonas se diluyen con buffer de carga LB 2x (1:1) y se llevan a ebullición durante 10min antes de ser cargadas. Las muestras se dejan migrar ~2h a 100V.

Para transferir las histonas a una membrana de nitrocelulosa, se aplica una corriente de 100V 30-45min en buffer de transferencia (TRIS-Glicina 1x, metanol 20%). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñe con rojo ponceau 30seg y se lava inmediatamente con agua destilada. Por último, se incuba 30min con solución de bloqueo TBST (20mM TRIS pH 8, 150mM NaCl, 0.2% TWEEN) y 5% BSA, y durante 1 hora o toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios α-H3K4me2 de conejo (Active Motif, 39913) 1:500 y α-HPa de ratón 1:500. Después se lava 3X con TBST y se incuba con los anticuerpos secundarios fluorescentes (1:20.000) durante una hora en oscuridad. Tras lavar 2X con TBST se procede a revelar la membrana con el sistema Odyssey.

Clonación ARNs guías. Diseño ARNs guías para proteínas Cas9 y Cas13

Con la herramienta online “RNAfold web server” se seleccionaron las secuencias del transposón F-element como ARN guía (ARNg) para la proteína Cas13. Estas secuencias cumplen las siguientes condiciones: no tener ≥4 “UUUU”, una longitud ~22nt con un contenido mínimo del 30% de pares GC y estar localizados en zonas accesibles libres de estructuras secundarias (tabla 1).

A través de la base de datos online “FlyRNAi.org” se seleccionaron secuencias del transposón F-element y las proteínas nucleares Panoramix (Panx) y Piwi, como ARNg para la proteína Cas9. Estas secuencias cumplen: no ≥ 4 “UUUU” y longitud de 20nt precedida por la secuencia “NGG” (tabla 1).

	ARN guía TOP (5'-3')
F-element 1-Cas13	CTT CAC AAA TTA GAC ACA CAA CAA AAC
F-element 2-Cas13	CTT CCA CAA AAT TAG ACA CAC AAC AAA ACT ATC
F-element 1-Cas9	CTT CTA TCG TGC TCC GCA CAA AAT
F-element 2-Cas9	CTT CTC CCA AAC GCA GAC ATC GAG
Panx-Cas9	CTT CAC TTT GAC CTC TAG CTT CAT
Piwi-Cas9	CTT CAC CAC TAC CTC GGG AAG TAG
	ARN guía BOTTOM (5' – 3')
F-element 1-Cas13	AAA CGT TTT GTT GTG TGT CTA ATT TTG T
F-element 2-Cas13	AAA CGA TAG TTT TGT TGT GTG TCT AAT TTT GTG
F-element 1-Cas9	AAA CAT TTT GTG CGG AGC ACG ATA
F-element 2-Cas9	AAA CCT CGA TGT CTG CGT TTG GGA
Panx-Cas9	AAA CAT GAA GCT AGA GGT CAA AGT
Piwi-Cas9	AAA CCT ACT TCC CGA GGT AGT GGT

Tabla 1.- Secuencias seleccionadas del transposón F-element y las proteínas Panoramix (Panx) y Piwi, como ARN guía para Cas13 y Cas9. Todas las secuencias están indicadas en sentido 5'-3'

En todos los ARNg TOP y BOTTOM se añaden los nucleótidos “CTTC” y “AAAC” respectivamente en el extremo 5'.

Clonación ARNs guías

Se digiere el vector pBFv6.2 con BpI y se incuba toda la noche con los ARNg top y bottom (tabla 1) anillados (incubando 5min a 95°C y dejando enfriar a temperatura ambiente) a 16°C con T4 ADN ligasa

(Roche). Tras la ligación se transforman bacterias XL-1 mediante choque térmico durante 2min a 42°C y se siembra en placa Petri con medio LB-Agar ampicilina 100µg/ml. Para seleccionar las colonias que han integrado el plásmido, se realizan PCRs con primer del vector pBFv6.2 (5'-GGG ACA GCT CAT GGT GCA CAG CTC-3') y los del ARNg usando Expand High Fidelity System de Roche. El condiciones de amplificación son: activación de la Taq polimerasa 94°C (2min), primeros 10 ciclos de amplificación (desnaturalización 94°C (15seg), anillamiento 59°C (30seg) y elongación 72°C (45seg)), segundos 10 ciclos de amplificación, se diferencian de los anteriores en que el tiempo de elongación aumenta 15seg en cada ciclo. Las colonias con producto de amplificación se crecen en LB a 37°C toda la noche y se extrae su ADN como se indica a continuación.

Clonación ARNs guías. Extracción ADN plasmídico por midiprep

Se centrifugan las bacterias a 3.000rpm 20min. El pellet se resuspende en 200µL de buffer de suspensión con RNasa A (QUIAGEN) y se incuba 10min a temperatura ambiente. Se añaden 400µL de buffer de lisis (QUIAGEN), se mezcla por inversión y se deja en hielo 2min. Tras añadir 300µL de buffer de neutralización (QUIAGEN), se mezcla por inversión y se incuba en hielo 3-5min. Luego se centrifuga a 14.000rpm 5min a 4°C y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo donde es fenolizado. El ADN se precipita añadiendo 600µL de isopropanol frío. Tras incubarlo a 2min se centrifuga a 15.000rpm 5min, el pellet se lava con etanol 70% y se resuspende en 50µL de TE.

Obtención de moscas transgénicas

La construcción final pBFv.6.2-ARNg fue inyectada en la línea germinal de moscas con genotipo *v-* (vermilion negativo). La recombinación e incorporación de la secuencia ARNg en las regiones 25B (cromosoma 2) o 65A (cromosoma 3) conduce a un rescate del gen *vermilion* en la descendencia. La descendencia *v+* se cruza con moscas portadoras de los balanceadores Cyo, If (cromosoma 2) o TM6, Tb, MKRS (cromosoma 3) para balancear el transgén.

Resultados

Embriogénesis

Para estudiar cuál es la función de F-element durante la embriogénesis temprana en *Drosophila*, lo sobreexpresamos en embriones (ver métodos). Mediante hibridaciones *in situ* comprobamos si la sobreexpresión de F-element se lleva a cabo de manera óptima y analizamos si dicho aumento de expresión altera el transcurso normal de la embriogénesis. En la figura 1 a-d, se demuestra la sobreexpresión de F-element en embriones nosGal4/UASF-element entre los ciclos 10-12 (<1.5h), demostrando que el sistema Gal4/UAS induce un aumento de la expresión de manera eficiente. En los núcleos que sobreexpresan F-element se observa un elevado número de loci donde se está llevando a cabo la transcripción del transposón (figura 1d), mientras que en los núcleos de embriones wt únicamente se puede observar uno o dos puntos de transcripción de F-element por núcleo (figura 1a). Al analizar los embriones fenotípicamente se detectan diversas alteraciones en los embriones nosGal4/UASF-element (figura 1 b-c, e-f). La sobreexpresión de F-element provoca que las células polares no formen una estructura compacta y no continúen el semicírculo marcado por las células del blastodermo (figura 1c). Además, en la figura 1f se muestra una vista de la superficie del embrión y se observa que las células del blastodermo dejan de dividirse sincrónicamente.

Al medir cuantitativamente mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de F-element relativos al gen *Rpl32* en tres periodos de tiempo de maduración diferentes, se observa que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de F-element en embriones wt y nosGal4/UASF-element entre los periodos 0-2h y 2-4h. El nivel de expresión de F-element pasa a ser significativamente mayor entre las 4-6h en embriones nosGal4/UASF-element (**p*<0.1) (figura 1g).

Para conocer más acerca del papel de F-element en la embriogénesis, analizamos espacial y temporalmente la presencia de diferentes marcas epigenéticas asociadas tanto a eucromatina como a heterocromatina mediante tinción con anticuerpos en embriones silvestres y con niveles más altos de F-element (ver métodos). En la figura 2, se muestra que la marca H3K4me2, asociada a expresión génica, aparece antes en el tiempo en embriones nosGal4/UASF-element (figura 2d) que en los embriones wt (figura 2a). Además, en embriones que sobreexpresan F-element, la marca H3K4me2 se mantiene en los núcleos durante la mitosis (figura 2e-f) mientras que en los embriones wt desaparece (figura 2b-c).

Como acabamos de comentar, se aprecia un cambio en la distribución de H3K4me2 en el tiempo, por ello, quisimos comprobar mediante western blot si éramos capaces de detectar un aumento de los niveles de H3K4me2 entre los embriones wt y nosGal4/UASF-element (figura 2g-h). En el gráfico por grupos (figura 2h) se representan los niveles relativos de H3K4me2 con respecto a la H3 (control de carga), siendo estos niveles relativos de H3K4me2 mayores en embriones wt que en embriones nosGal4/UASF-element. Además, no se muestra una correlación entre los niveles relativos de H3K4me2 con los volúmenes cargados en ninguno de los dos casos, siendo más evidente en embriones wt, que presenta el nivel relativo de H3K4me2 más alto con un volumen de 15µL y el nivel más bajo con un volumen de 20µL (figura 2h).

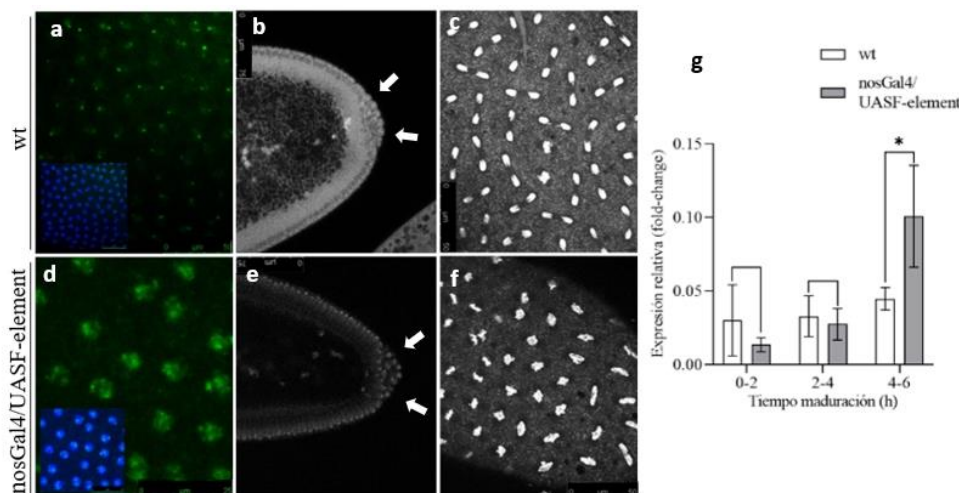


Figura 1.- La sobreexpresión de F-element altera la embriogénesis temprana. Fotografías tomadas a núcleos periféricos del blastodermo de embriones wt (a-c) y nosGal4/UASF-element (d-f) a lo largo del desarrollo embrionario temprano. Los embriones están teñidos con TOPRO3 para marcar los núcleos en azul. a, d Hibridación *in situ* con sonda F-element en verde de embriones en ciclo 11. Se observa mayor expresión de F-element en los embriones nosGal4/UASF-element (d). b, e Eje central de embriones. Las flechas señalan las células polares del embrión. En embriones nosGal4/UASF-element las células polares no forman una estructura compacta y no continúan el semicírculo marcado por las células del blastodermo (e). c, f Mitosis de las células del blastodermo. En embriones nosGal4/UASF-element (f) las células han dejado de dividirse sincrónicamente. g Expresión relativa del transposón F-element con respecto al gen *Rpl32*. No se detectan diferencias significativas en los niveles de expresión de F-element en embriones wt y nosGal4/UASF-element entre los periodos 0-2h y 2-4h. El nivel de expresión de F-element es significativamente mayor entre las 4-6h en embriones nosGal4/UASF-element (* $p < 0.1$). Los resultados se representan como media \pm desviación estándar en un gráfico por grupos. El test estadístico empleado es t-test, siendo 3 el número de réplicas realizadas de un n elevado.

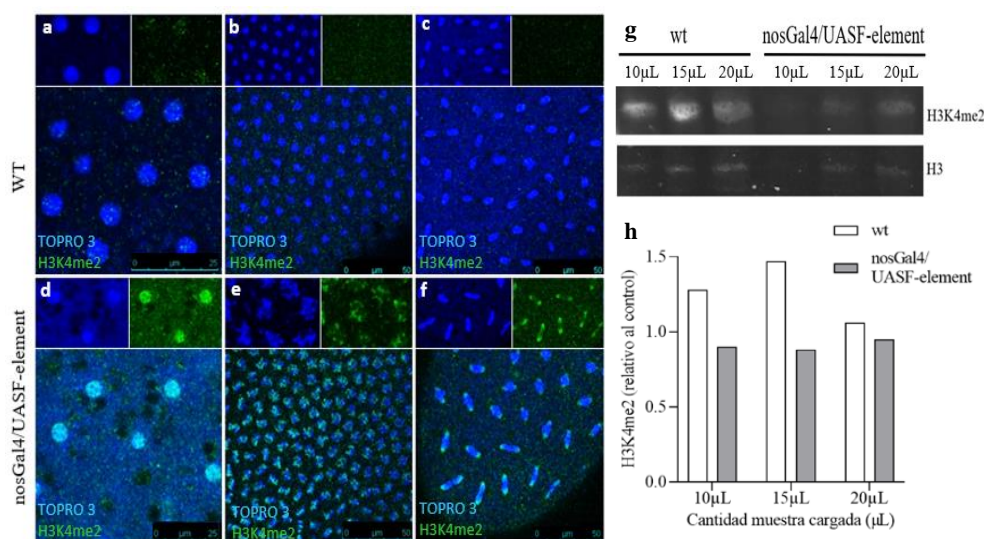


Figura 2.- a-f La expresión temprana de F-element en el desarrollo embrionario altera la aparición de la marca de expresión génica H3K4me2. Fotografías tomadas a núcleos de embriones wt (a-c) y nosGal4/UASF-element (d-f) durante la embriogénesis temprana. Los embriones están teñidos con TOPRO3 para marcar los núcleos en azul, la modificación H3K4me2 se detecta con un Ac 1rio α -H3K4me2 y un ac 2rio fluorescente verde. De cada fotografía se han añadido otras dos de una sección representativa ampliada seleccionando únicamente el canal azul (TOPRO3) o verde (F-element). a, d Núcleos del blastodermo condensándose antes de la mitosis (ciclo 12). c, f Núcleos del blastodermo en división (ciclo 10). a No se detecta la marca H3K4me2 en los núcleos <ciclo 8. b-c No se detecta la marca H3K4me2 en núcleos en división. d-f La intensidad con la que se detecta la marca de expresión H3K4me2 es muy alta tanto en núcleos sin dividir, como en núcleos en división. g-h Análisis cuantitativo de la proteína H3K4me2 en embriones wt y nosGal4/UASF-element. g Diferentes volúmenes de lisado con histonas se analizan por western blot con ac α -H3K4me2 (1:5000) y α -H3 (1:5000) como control de carga. h Expresión relativa de la H3K4me2 con respecto al control de carga (H3) en embriones wt y nosGal4/UASF-element. No se aprecian diferencias de los niveles de H3K4me2 entre ambos tipos de embriones. Los datos se corresponden con la media de un n representativo y se muestran en un gráfico por grupos.

Regeneración de disco imaginal de ala. F-element se expresa 30h post-muerte

Mediante el sistema Gal4/tubGal80^{ts}UAS, se induce durante 24h la muerte celular por apoptosis de la región del primordio de ala del disco imaginal de ala de *Drosophila* al producirse la sobreexpresión del gen pro-apoptótico *Reaper* (*Rpr*). La expresión de F-element se detectó mediante hibridación *in situ* en tres periodos de tiempo diferentes: 0h, 24h y 30h post-muerte (figura 3). A las 0h post-muerte se muestra el área total de la región del primordio de ala que se ve afectada por la expresión de *Rpr*. A las 24h post-muerte, gran parte del área dañada ha sido regenerada por células procedentes de las zonas vecinas que rodean la región del ala, las cuales se desdiferencian y migran hacia la zona dañada para diferenciarse hacia un fenotipo celular diferente. Tanto a las 0h como a las 24h post-muerte no se detecta expresión de F-element. Transcurridas 30h post-muerte, la región del primordio de ala recupera en gran medida su estructura y morfología característica, además, se detecta una elevada expresión de F-element.

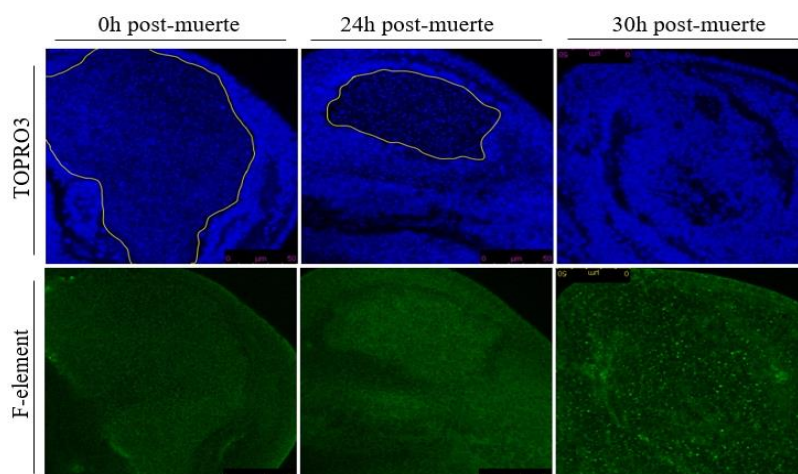


Figura 3.- Análisis de la expresión de F-element mediante hibridación *in situ* durante la regeneración de la región del primordio de ala del disco imaginal de ala en estadio larva 3. Las fotografías muestran la región del primordio de ala 0, 24 y 30 horas post-muerte, tras inducir apoptosis durante 24h con el sistema Gal4/tubGal80^{ts}UAS. Los discos están teñidos con TOPRO3 para marcar los núcleos en azul, la sonda F-element se muestra en verde. El área delimitada por la línea amarilla es la región del primordio de ala dañada, donde se observan agregados de ADN tras la muerte celular. A las 0h post-muerte no se detecta expresión de F-element, la región del primordio de ala está completamente dañada. 24h post-muerte no se detecta expresión de F-element, el área dañada se ha reducido con respecto a las 0h post-muerte. 30h post-muerte se detecta expresión de F-element, la región del ala ha sido regenerada por completo.

Regeneración de disco imaginal de ala. La expresión de F-element puede influir en el grado de regeneración del disco de ala

Larvas yw y nubGAL4/UASF-element fueron irradiadas con una dosis de 3000R de rayos X en estadio 1 para comparar si la sobreexpresión de F-element influye en la regeneración del disco imaginal de ala. A las 24 y 48h, larvas en estadio 3 fueron diseccionadas para determinar el porcentaje de discos que presentan un desarrollo normal o, por el contrario, presentan alguna variación en su morfología (tabla 2). El 60% de los discos de larva wt (n=30) presentan una morfología normal, frente a un 84.6% en larvas nubGal4/UASF-element (n=26) (tabla 2). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de F-element podría estar influyendo positivamente al proceso de regeneración.

	Morfología normal	Morfología alterada	Total (n, %)
yw (n, %)	18 (60%)	12 (40%)	30 (100%)
nubGal4/UASF-element (n, %)	22 (84.6%)	4 (15.4%)	26 (100%)

Tabla 2.- Clasificación de discos imaginales de ala de larva 3 wt (n=30) y nubGal4/UASF-element (n=26) según su morfología 24 y 48h después de ser irradiadas con 3000R de rayos X. Para realizar la clasificación se toma como referencia los discos de la figura 4a-c.

Las larvas irradiadas continuaron su desarrollo hasta mosca adulta y en éstas se analizó el fenotipo final del ala, que dependerá del grado de regeneración del disco de ala durante la fase larvaria. En la tabla 3 se incluyen el número y el porcentaje de alas wt y nubGAL4/UASF-element dentro de las categorías “Completa”, “Alto” y “Bajo”, según el grado de regeneración. El porcentaje de alas de moscas wt que presentan un fenotipo normal es de un 37% frente a un 46% de moscas nubGAL4/UASF-element. Entre las alas de moscas wt en las que la regeneración del ala no ha sido completa, un 26% muestran daño leve y un 37% daño severo. En las alas de moscas nubGAL4/UASF-element, un 42% presentan daño leve y un 12% daño severo. Estos resultados vuelven a confirmar lo que parece ser una implicación directa de F-element en el proceso de regeneración.

	Completa	Alto	Bajo	Total (n, %)
wt (n, %)	7 (37%)	5 (26%)	7 (37%)	19 (100%)
nubGal4/UASF-element (n, %)	12 (46%)	11 (42%)	3 (12%)	26 (100%)

Tabla 3.- Clasificación de alas de moscas wt (n=19) y nubGal4/UASF-element (n=26) en las categorías “Completa”, “Alto” y “Bajo” según el grado de regeneración que presentan tras ser irradiadas con 3000R de rayos X. Las alas se clasifican tomando como referencia las imágenes de la figura 4d-e.

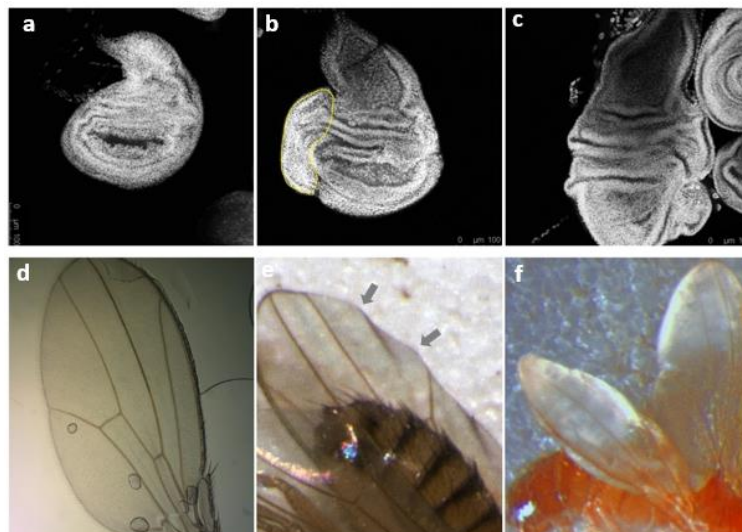


Figura 4.- Análisis de regeneración del disco imaginal de ala tras irradiar con una dosis de 3000R de rayos X. a-c Discos imaginales de ala tomados como referencia para cuantificar los discos que presentan o no variaciones en su estructura. Los discos están teñidos con TOPRO3 para marcar los núcleos. a Estructura normal del disco de ala de larva 3. b Disco con exceso de proliferación en el área marcada en amarillo. c Disco de ala con estructura gravemente alterada. d-f Alas de mosca adulta tomadas como referencia para clasificar y cuantificar el grado de regeneración del ala durante la fase larvaria. a Regeneración completa. El ala presenta un fenotipo normal. b Grado de regeneración alto. Las alas presentan pequeñas imperfecciones sin afectar a su funcionalidad. Las flechas señalan una leve deformación en el margen posterior del ala. c Grado de regeneración bajo. Las alas muestran daños graves en la estructura influyendo en su funcionalidad.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos, un aumento de la expresión de F-element durante la embriogénesis temprana parece estar relacionado con la aparición de diversas alteraciones fenotípicas en los embriones (figura 1a-f). Los núcleos, antes de formar el blastodermo en el ciclo 14 y celularizar, se dividen 12 veces sincrónicamente [12], sin embargo, una de las alteraciones observadas más frecuentes en los embriones que sobreexpresan F-element, es la pérdida de sincronía durante las divisiones nucleares previas al ciclo 14 (figura 1f). Otra alteración igualmente frecuente, afecta a las células germinales del embrión. Mientras en embriones silvestres, las células polares forman una estructura compacta que continúa el semicírculo marcado por las células del blastodermo (figura 1b), en embriones con niveles más altos de F-element forman una estructura irregular, poco compacta y de mayor tamaño (figura 1e).

Estas alteraciones aparecen durante las primeras 2h del desarrollo en embriones nosGal4/UASF-element, en los cuales, la señal de F-element detectada mediante hibridación *in situ* es mucho mayor que en embriones wt (figura 1a,d). Según esto, al comparar cuantitativamente mediante RT-qPCR los niveles de expresión relativos de F-element, cabría esperar que estos fueran mayores en embriones nosGal4/UASF-element. Sin embargo, el nivel de expresión de F-element no pasa a ser significativamente mayor hasta las 4h en los embriones nosGal4/UASF-element (figura 1g). Una posible razón por la cual no se detectan cuantitativamente diferencias entre los niveles de expresión de F-element a las 0-2h y 2-4h, es que el embrión herede cantidades de Piwi suficientes como para procesar los nuevos transcritos del transposón F-element. Hoy día sabemos que Piwi forma parte de los productos maternos heredados por el embrión, y que en condiciones normales, a partir del ciclo 11 pasa a localizarse en el núcleo para iniciar el silenciamiento cotranscripcional de transposones [15,16]. Para comprobar esta hipótesis, sería interesante analizar la localización celular de Piwi en embriones nosGal4/UASF-element mediante tinción con anticuerpos para ver si, ante un aumento de la concentración de nuevos transcritos de F-element, Piwi pasa de localizarse en el citoplasma y a localizarse en los núcleos para procesar F-element.

Además, la sobreexpresión de F-element durante los primeros ciclos del desarrollo embrionario provoca un cambio en la distribución de la marca de expresión H3K4me2 en el tiempo (figura 2a-f). En la embriogénesis temprana, la dimetilación de la H3K4 se establece de manera uniforme en el ciclo 13 por

todo el núcleo [14]. En el ciclo 14, en las regiones donde se forma la heterocromatina, la H3K4me2 es desmetilada y aparece la marca de silenciamiento H3K9me3 [14]. Sin embargo, en embriones con altos niveles de F-element, la H3K4me2 se detecta en núcleos pre-blastodérmicos (<ciclo 8) que no han migrado hacia la periferia (figura 2d). Hasta ahora, se conoce que Piwi, guiada por ARNpi, se une a las secuencias de transposones que están siendo transcritas en el embrión e interacciona con la enzima Panoramix, que recluta a las enzimas Lsd1 y SetDB1, para desmetilar la H3K4me2 y metilar la H3K9me3, respectivamente e inducir la formación de heterocromatina [3]. Según los resultados obtenidos, la sobreexpresión de F-element parece favorecer la metilación de la H3K4, aunque hoy día no se conoce la existencia de enzimas o complejos enzimáticos que induzcan la metilación de la H3K4 a partir de la expresión de transposones. Esto lleva a plantearnos que, durante la embriogénesis temprana, tienen lugar una serie de procesos totalmente controlados y ordenados en el tiempo, de modo que, las diferentes marcas epigenéticas, aparecen y desaparecen siguiendo un orden que permite controlar la expresión de determinados genes clave en la embriogénesis, mediante la organización de la cromatina en eu- y hetero- cromatina. De acuerdo a los resultados, la expresión de F-element desde un estadio más temprano acelera la aparición de la H3K4me2, por lo tanto, podemos pensar que la expresión de algunos transposones como F-element podría ser necesaria para la adquisición de la marca H3K4me2, y que una vez establecida, se inicie el silenciamiento cotranscripcional y la formación de heterocromatina mediante la desmetilación de la H3K4me2 y la trimetilación de la H3K9. Para comprobar esta hipótesis, sería conveniente analizar si la H3K4me2 retrasa su aparición (>ciclo 12) en ausencia de F-element, así como, analizar si la H3K9me3 también muestra un cambio en su distribución en el tiempo.

Como se ha comentado previamente en los resultados, tras detectar una variación en el momento de aparición de la H3K4me2, quisimos ver si éramos capaces de detectar un aumento de los niveles de H3K4me2 entre los embriones wt y nosGal4/UASF-element mediante western blot. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre los niveles relativos de H3K4me2 en embriones nosGal4/UASF-element y wt. Consideramos que los resultados han podido verse condicionados por una falta de control del tiempo de maduración de los embriones. Si suponemos que la cantidad de H3K4me2 es mayor durante el periodo de 0-2h en embriones nosGal4/UASF-element, y que esta diferencia desaparece a partir de las 2h, si no se controla el tiempo de maduración de los embriones, no podemos afirmar que no haya diferencias en los niveles de H3K4me2 durante la embriogénesis temprana (0-2h), si no que no hay diferencias en los niveles de H3K4me2 a lo largo de todo el proceso de embriogénesis entre los embriones wt y nosGal4/UASF-element. Además, a la hora de cuantificar, no se detecta una correlación entre los niveles relativos de H3K4me2 con los volúmenes cargados, siendo más evidente en embriones wt. Esto puede deberse a múltiples motivos, por ejemplo, que las histonas no fueron resuspendidas homogéneamente tras su extracción o que ha habido errores a la hora de pipetear las cantidades indicadas.

En este estudio, los experimentos realizados se basan en la sobreexpresión de F-element, sin embargo, para poder estudiar en detalle la función de F-element en la embriogénesis temprana, habría que realizar a su vez experimentos basados en el silenciamiento de F-element. Por ello, decidimos obtener moscas transgénicas para los ARN guías de F-element y las proteínas Piwi y Panoramix (ver métodos), involucradas en el silenciamiento cotranscripcional de transposones para la formación de heterocromatina [4], para poder estudiar en el futuro las consecuencias del silenciamiento de estos genes mediante la técnica de silenciamiento CRISPR-Cas9.

El objetivo de analizar el papel de F-element durante la regeneración de la región del primordio de ala del disco imaginal de ala de *Drosophila*, es poder comparar los procesos de desdiferenciación y diferenciación hacia un fenotipo celular diferente por los que pasan las células de la región de bisagra que regeneran la región del primordio de ala [17], con el proceso de establecimiento de la cromatina madura en el embrión en desarrollo. En la figura 3, se demuestra que F-element es expresado por las células que cubren la región del primordio de ala 30h después de haberse iniciado el proceso de regeneración. Según esto, podemos plantear que, al igual que en la embriogénesis temprana, F-element participa en el proceso de diferenciación celular. Para demostrar que F-element participa en el control de la expresión de determinados genes mediante la adquisición y pérdida de diferentes modificaciones de histonas, se podrían realizar tinciones con anticuerpos α -H3K4me2 y α -H3K9me3 en larvas wt y nubGal4/UASF-element para ver si su distribución en el tiempo se ve condicionada por la expresión de F-element.

Por último, se quiso analizar si la sobreexpresión de F-element influye en el grado de regeneración del disco imaginal de ala tras inducir la muerte celular de manera general con una dosis de 3000R de rayos X. Los datos recolectados en las tablas 2 y 3, reflejan que los discos imaginales de ala, así como las alas de moscas nubGal4/UASF-element irradiadas, presentan porcentajes de regeneración mayores que las moscas yw. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de F-element en la región del primordio de ala tiene un efecto beneficioso en el proceso de regeneración. No obstante, hay que tener en cuenta que al irradiar con rayos X, no se controla la cantidad de daño producido sobre el disco imaginal de ala, al igual que tampoco se controlan las regiones que son dañadas. Por tanto, aunque los embriones nubGal4/UASF-element sobreexpresen F-element en la región del primordio de ala, hay otros factores aleatorios que pueden influir en su regeneración. Por tanto, para analizar los efectos de la sobreexpresión de F-element, proponemos, inducir daño selectivamente sobre la región del primordio de ala mediante el sistema Gal4/tubGal80^{ts}UAS

(ver métodos) y sobreexpresar F-element en dicha región mediante CRISPRa, una variante de la técnica CRISPR-Cas, en la que se induce la expresión de un determinado gen mediante un ARNg, una proteína Cas9 sin actividad catalítica (dCas9) y el complejo CRISPR asociado a un activador transcripcional [18].

Referencias

1. Grewal, S. and Elgin, S. 2007. Transcription and RNA in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447(7143):399-406.
2. Grewal, S. and Elgin, S. 2002. Heterochromatin: New Possibilities for the Inheritance of Structure. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2):178-187.
3. Batki, J., Schnabl, J., Wang, J., Handler, D., Veselin, I.A., & Stieger, C.E., Novatchkova, M., Lampersberger, L., Kauneckaitė, K., Xie, W., Mechtler, K., Patel, D.J. and Brennecke, J. 2019. The Nascent RNA Binding Complex Sfinx Licenses piRNA-Guided Heterochromatin Formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(8):720-731.
4. Bhaskara, S., Knutson, S.K., Jiang, G., Chandrasekharan, M.B., Wilson, A.J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J. L., Bonine-Summers, A.R., Wells, C.E., Kaiser, J.F., Washington, M.K., Zhao, Z., Wagner, F.F., Sun, Z.W., Xia, F., Holson, E.B., Khabele, D. and Hiebert, S.W. 2010. Hdac3 is Essential for the Maintenance of Chromatin Structure and Genome Stability. *Cancer cell*, 18(5):436-447.
5. Meister, G. 2013. Argonaute Proteins: Functional Insights and Emerging Roles. *Nature Reviews Genetics*, 14(7):447-459.
6. Kavi, H.H., Fernandez, H., Xie, W. and Birchler, J.A. 2008. Genetics and Biochemistry of RNAi in *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 320:37-75.
7. Tchurikov, N.A. and Kretova, O.V. 2011. Both piRNA and siRNA Pathways Are Silencing Transcripts of the Suffix Element in the *Drosophila melanogaster* Germline and Somatic Cells. *PLoS ONE*, 6(7):e21882.
8. Kerber, B., Fellert, S., Taubert, H. and Hoch, M. 1996. Germ Line and Embryonic Expression of Fex, a Member of the *Drosophila* F-element Retrotransposon Family, is Mediated by an Internal cis-Regulatory Control Region. *Mol. Cell Biol.*, 16(6):2998-3007.
9. Minchiotti, G., Contursi, C. and Di Nocera, P.P. 1997. Multiple Downstream Promoter Modules Regulate the Transcription of the *Drosophila melanogaster* I, Doc and F elements. *J. Mol. Biol.*, 267(1):37-46.
10. Tchurikov, N.A. and Kretova, O.V. 2007. Suffix-specific RNAi Leads to Silencing of F Element in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 2(5):e476.
11. Minchiotti, G., Contursi, C., Graziani, F., Gargiulo, G. and Di Nocera, P.P. 1994. Expression of *Drosophila melanogaster* F elements in vivo. *Mol. Gen. Genet.*, 245(2):152-9.
12. Farrell, J.A. and O'Farrell, P.H. 2014. From Egg to Gastrula: How the Cell Cycle is Remodeled During the *Drosophila* Mid-Blastula Transition. *Annu. Rev. Genet.*, 48:269-94.
13. He, S., Zhang, G., Wang, J., Gao, Y., Sun, R., Cao, Z., Chen, Z., Zheng, X., Yuan, J., Luo, Y., Wang, X., Zhang, W., Zhang, P., Zhao, Y., He, C., Tao, Y., Sun, Q. and Chen, D. 2019. 6mA-DNA-Binding Factor Jumu Controls Maternal-to-Zygotic Transition Upstream of Zelda. *Nat. commun.*, 10(1):2219.
14. Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schäfer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T. and Reuter, G. 2007. Heterochromatin Formation in *Drosophila* is Initiated Through Active Removal of H3K4 Methylation by the LSD1 Homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell.*, 26(1):103-15.
15. Ninova, M., Griffiths-Jones, S. and Ronshaugen, M. 2017. Abundant Expression of Somatic Transposon-Derived piRNAs Throughout *Tribolium castaneum* Embryogenesis. *Genome biology*, 18(1):184.
16. Mani, S.R., Megosh, H. and Lin, H. 2014. PIWI Proteins are Essential for Early *Drosophila* Embryogenesis. *Developmental biology*, 385(2):340-349.
17. Hariharan, I.K. and Serras, F. 2017. Imaginal Disc Regeneration Takes Flight. *Current opinion in cell biology*, 48:10-16.
18. Dong, C., Fontana, J., Patel, A., Carothers, J.M. and Zalatan, J.G. 2018. Synthetic CRISPR-Cas Gene Activators for Transcriptional Reprogramming in Bacteria. *Nat Commun.*, 9(1):2489.